Die Serumfermentkonstellation normaler Laboratoriumstiere

Agarelektrophoretische Studien zur Charakterisierung der Serumfermente von Kaninchen, Ratte, Maus, Meerschweinchen und Goldhamster

---

von

Ursula Bossert

aus Nürnberg

1967

1967 № 257

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535706_0010

Aus der Abteilung für klinische Immunologie
des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg
Vorstand: Prof. Dr. F. Scheiffarth

Die Serumfermentkonstellation normaler Laboratoriumstiere

Agarelektrophoretische Studien zur Charakterisierung der Serumfermente von Kaninchen, Ratte, Maus, Meerschweinchen und Goldhamster

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
zu Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Ursula Bossert
aus Nürnberg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen
Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DEKAN: Prof. Dr. K.-G. OBER

REFERENT: Prof. Dr. F. SCHEIFFARTH

Tag der mündlichen Prüfung: 19. August 1967

Inhaltsübersicht

A) Einleitung

B) Hauptteil

I) Untersuchungsgut und Versuchsanordnung

II) Methodik
1. Agarelektrophorese
2. Färbemethoden

III) Ergebnisse
Agarelektrophoretische Ergebnisse von Färbe- und Fermentreaktionen
1. Kaninchen
2. Ratte
3. Maus
4. Meerschweinchen
5. Goldhamster

IV) Diskussion

C) Zusammenfassung

D) Literaturnachweis

A) Einleitung

In früheren eigenen (2, 17, 19, 20, 24, 25) sowie in der Literatur mitgeteilten Arbeiten (1, 3, 4, 5, 6, 11, 13, 14, 15, 28) wurden die serologischen Analysen von insgesamt 9 verschiedenen Tieren (Hammel, Rind, Pferd, Schwein, Katze, Hund, Ziege, Huhn, Ente), die als Versuchstiere für die Grundlagenforschung eine Rolle spielen, mitgeteilt. Es zeigte sich für jede Tierart ein charakteristisches Protein- und Fermentmuster, das unter den verschiedenen Tierspezies verwandte Charakteristika aufwies, im wesentlichen aber dennoch artspezifische Kriterien zeigte. Im nachfolgenden sollen nun vor allem die Seren von Kleintieren, die in biologischen Laboratorien ebenso wie in bakteriologisch-serologischen Instituten bzw. für tierexperimentell anzugehende Fragen der Grundlagenforschung als auch der experimentellen und klinischen Pathologie Bedeutung erlangen, beschrieben werden. Die Kenntnis ihrer Protein- und Fermentkonstellation gewinnt im Hinblick auf den großen Anwendungsbereich ganz besonders an Interesse.

Im einzelnen wird über die Ergebnisse der agarelektrophoretisch getrennten Seren von Kaninchen, Ratte, Maus, Meerschweinchen und Goldhamster berichtet.

B) Hauptteil

I) Untersuchungsgut und Versuchsanordnung

Es wurden die Seren von Kaninchen, Maus, Ratte, Meerschweinchen und Goldhamster - verwendet wurden ausschließlich haemolyse- und lipaemiefreie, klare Seren - agarelektrophoretisch getrennt und anschließend auf ihre Färbbarkeit mit Amidoschwarz 10 B (Darstellung der Proteine), Schiffschem Reagenz (Darstellung der Glukoproteide), Sudanschwarz B (Darstellung der Lipoproteide) ferner auf ihren Anteil an esteraseaktiven, LDH-aktiven, peroxydase-, amylase-, alkalischer Phosphatase- sowie oxydaseaktiven Komponenten geprüft. Andere Farbreaktionen kamen nicht zur Anwendung.

II) Methodik

1. Agarelektrophorese
   nach GRABAR und WILLIAMS (7, 8, 9, 10, 33) in der Modifikation der Objektträgermethode von J. J. SCHEIDEGGER (17)

Herstellung des Agars: Zur Herstellung des Agars wurden 30 g Agar-Agar (Difco-Agar) mit 800 ml aqua dest. zum Quellen gebracht, sodann im kochenden Wasserbad verflüssigt, nach Erkalten in kleine Würfel geschnitten und mit aqua dest. mehrmals gewaschen. Nach Feststellen des Prozentgehaltes an Agar wurde der Agar wieder verflüssigt, mit heißem aqua dest. auf eine Konzentration von 3 % gebracht und mit heißer Pufferlösung (Veronalpuffer nach MICHAELIS ph 8,6 - Ionenstärke 0,05) zu gleichen Teilen gemischt.

Der so zubereitete Agar wurde in flüssigem Zustand durch einen Büchnertrichter genutscht, mit einigen Tropfen Merfen (Merfen-Konzentrat Zyma-Blaes, München) versetzt und im Erlenmeyerkolben aufbewahrt.

Herstellung der Elektrophoreseplatten: Ein fettfreier Objektträger wird mit 3 ml heißem Elektrophoreseagar beschickt. Nach Erkalten wird in der Mitte der Platte die 2 x 10 mm messende Auftragestelle ausgestanzt und mit einem Gemisch in folgender Verdünnung aufgefüllt: Serum 0,2 ml, aqua dest. 0,1 ml und Agar 0,4 ml. Die Startstelle wird mit blankem Agar bedeckt. Kleine 50 mm lange Papiere (Whatman Nr. 1) werden in doppelter Lage mit Michaelispuffer getränkt und an beiden Enden an die Objektträger angelegt. Im elektrischen Gleichstromfeld (90 Volt) beträgt die durchschnittliche Wanderungsgeschwindigkeit bei 10 Objektträgern ca. 100 Minuten. Nach Beendigung der Trennung werden die Platten je nach beabsichtigter Färbung oder Fermentnachweisreaktion weiterbehandelt.

2. Färbemethoden

Proteinfärbung mit Amidoschwarz 10 B (7, 9, 27, 28 b, 30)

1 g Amidoschwarz 10 B wird in 1000 ml eines Gemisches von Azetatpuffer und Glyzerin gelöst.
Herstellung des Azetatpuffers: 500 ml Essigsäure (60 ml auf 1000 ml aqua dest.) werden mit 500 ml einer Natrium-Azetatlösung (13,6 g Natrium-Azetat + 3 H_2O auf 1000 ml aqua dest.) gemischt.
850 ml dieses Puffers werden mit 150 ml Glyzerin versetzt.

Die Agarplatten, die vorher in 2 %iger Essigsäurelösung präzipitiert und unter Filterpapier bei 37° C getrocknet wurden, werden 3 Stunden lang in der Färbelösung belassen. Entfärben in 2 %iger Essigsäurelösung (mit Glyzerin versetzt) einige Stunden lang unter mehrmaligem Wechseln des Entfärbers.

Kohlehydratfärbung mit Schiffschem Reagenz (7, 9, 27, 29)

Lösung I:
10 %iges Hydroxylaminchlorhydrat in Natriumpuffer ph 4,7 - Ionenstärke 0,1.
Der Natriumpuffer wird wie folgt zusammengestellt:

a) 12 ml Eisessig ad 1000 ml einer 50 %igen Alkohollösung (500 ml 96 %iger Äthylalkohol ad 1000 ml aqua dest.)

b) 27,2 g Natrium-Azetat + 3 H_2O ad 1000 ml 50 %igen Äthylalkohol

von a) 455,0 ml, von b) 545,0 ml mischen.
Dies ist der gewünschte Natrium-Azetatpuffer ph 4,7 - Ionenstärke 0,1. 20 g Hydroxylaminchlorhydrat und 200 ml obigen Puffers ergeben die Lösung I.

Lösung II:
1 %ige Perjodsäure gelöst in einer 0,2 m Natrium-Azetatlösung. Es werden 27,2 g Natriumazetat in 1000 ml aqua dest. gelöst, von dieser 2 molaren Lösung 200 ml mit 2 g Acidum perjodicum cryst. gemischt.

Lösung III:

Schiffsches Reagenz: 1, 5 g Fuchsin in 500 ml kochendem aqua dest. lösen und auf 55° C abkühlen lassen. Filtrieren. Weiter abkühlen lassen auf 40° C, dem Filtrat 25 ml einer 2 n Salzsäure und 3, 75 g Natriumpyrosulfit hinzugeben. (2 n Salzsäure = 100 ml aqua dest. dazu 7, 3 ml Acidum hydrochloricum) Schütteln und die Lösung in einem Rundkolben auf 500 ml mit aqua dest. auffüllen. Für die Dauer von 16 Stunden in den Eisschrank stellen. Danach 2 - 3 Kohle-Kompretten hinzugeben, 40 - 60 Sekunden belassen und unverzüglich filtrieren. Aufbewahren der Lösung bei 4° C. Unmittelbar vor Gebrauch wird das Schiffsche Reagenz 1 : 1 mit aqua dest. verdünnt.

Lösung IV:

50 ml einer 10 %igen Natriummetabisulfitlösung (10 g Na-pyrosulfurosum ad 100 ml aqua dest.) zusammen mit 50 ml einer 2 n Salzsäure auf 1000 ml aqua dest. auffüllen.

Lösung V:

Lösung IV zu 20 % mit Glyzerin versetzen. (40 ml Glyzerin ad 200 ml der Lösung IV)

Arbeitsgang:

Nach Abschluß des Trennvorgangs kommen die Elektrophoreseplatten für 6 - 10 Stunden in 2 %ige Essigsäure. Trocknen der Platten unter Filterpapier bei 37° C im Brutschrank. Danach kann gefärbt werden.

15 Minuten in Lösung I

15 Minuten unter fließendem Leitungswasser waschen

10 Minuten in Lösung II

10 Minuten unter fließendem Leitungswasser waschen

3 Minuten in Lösung III (Schiffsches Reagenz + aqua dest.)
3 x 2 Minuten in Lösung IV unter Wechseln der Lösung
3 x 1 Stunde in Lösung V unter Wechseln der Lösung
Trocknen der Platten bei 37° C ohne Filterpapier

Lipoproteidfärbung mit Sudanschwarz B (7, 9, 11, 29, 30)

Herstellen einer 0,5 - 1 %igen Sudanschwarzlösung in 60 %igem Äthanol. Dazu mischt man 120 ml 96 %igen Alkohol mit 80 ml aqua dest. in einem normalen Kolben und fügt 2 g Sudanschwarz B hinzu. Mehrmals filtrieren und im Wasserbad erhitzen. Die Agarplatten werden aus dem Elektrophoresekasten in diese Lösung 30 Minuten gelegt. Die anschließende Entfärbung geschieht in 50 %igem Äthanol (100 ml 96 %igen Äthylalkohol mit 100 ml aqua dest.) dreimal fünfzehn Minuten unter Wechseln der Entfärberflüssigkeit. Das dritte Mal mengt man einige Tropfen Glyzerin unter die Lösung.

Nachweis esteraseaktiver Fermente (9, 24)

a) mit Indoxylazetat
50 mg Indoxylazetat (β-Acetoxy-indol) werden in 5 ml Azeton gelöst. Hinzu kommen 220 ml Na-Veronalpuffer ph 8,2 - 0,05 Ionenstärke und 25 ml Cu(II)-Azetatlösung.

Herstellung des Puffers:
23,6 g Veronal-Natrium
1500 ml aqua dest.
320 ml n/10 HCL

Die Elektrophoreseplatten werden in dieser Lösung im Brutschrank bei 37° C 4 Stunden inkubiert. Anschließend müssen sie 1 Stunde in H_2O gewaschen werden. Trocknen unter Filterpapier bei 37° C. Das unter Fermentwirkung freigewordene Indoxyl oxydiert durch den atmosphärischen Sauerstoff zu Indigo und hinterläßt somit eine Blaufärbung.

b) mit β-Naphthylazetat

50 mg β-Naphthylazetat (Essigsäure-Naphthylester naphtholfrei zur Bestimmung von Esterasen) werden in 2,5 ml Aceton puriss. gelöst. Dazu gibt man 250 ml Phosphatpuffer und 100 ml Diazo-Blau-B. Schütteln, filtrieren und über die Agarplatten gießen. Die Lösung ist nicht haltbar.

Herstellung des Phosphatpuffers:
Von Merck Darmstadt Titrisolpuffer ph 7,00 im Plastik-Kolben mittels eines Glasstabes durchstoßen. Anschließend insgesamt 500 ml aqua dest. durchlaufen lassen, d.h. mit Puffer mischen.

Fermentnachweisreaktion der Laktat-Dehydrase (LDH) nach VAN DER HELM (32)

Lösung I:

a) 50 ml einer 1 n Natriumlaktatlösung
15 ml Na-laktatlösung + 67,5 ml aqua dest.

b) 50 ml 0,1 m Kaliumcyanidlösung
325 mg KCN in 50 ml aqua dest. lösen.

c) 125 ml Phosphatpuffer ph 7,4 - 0,5 Ionenstärke

d) 125 ml Nitroblautetrazolin (1 mg/ml)
125 ml Nitro BT + 125 ml aqua dest.

Von diesen Lösungen mischt man von
a) 50 ml, b) 50 ml, c) 125 ml, d) 125 ml
zusammen 350 ml Lösung I.

Vor Beginn der Färbung werden 70 ml der Lösung I mit 12,5 ml des nun folgenden Gemisches vermengt:

a) 100 mg DPN gelöst in 10 ml aqua dest.

b) 3 mg Phenazinmethosulfat (lichtempfindlich) in 3 ml aqua dest. lösen. Davon mischt man 2,5 ml mit 10 ml der Lösung a) zusammen 12,5 ml.

Die Präparate in einer Cuvette mit der Lösung übergießen. Mit einer Glasplatte bedecken und für 1 bis 1 1/2 Stunden in den Brutschrank bei 37° C stellen. Zum Auspräzipitieren in eine frische Cuvette legen und mit 70 %igem Alkohol übergießen. (140 ml 96 %igen Äthylalkohol ad 200 ml aqua dest.) 10 ml Eisessig ad 200 ml mit dieser Lösung übergießen und über Nacht stehen lassen.

Nachweis der Peroxydase (8, 10, 28)

Im Wasserbad werden 2 g Benzidin mit 20 ml Eisessig bis 56° C erhitzt. Danach läßt man die Lösung abkühlen und füllt auf ad 100 ml aqua dest. Nach Zugabe von 6 Kohletabletten 15 Minuten stehen lassen, schütteln, filtrieren und einige Tropfen H_2O_2 hinzufügen. Die Agarplatten bleiben 30 Minuten in dieser Lösung. Sofort photographieren, da nicht haltbar. Es entsteht im Bereich peroxydaseaktiver Fraktionen (α_2 - β_1-Globulinbereich) eine tief dunkelblaue Färbung.

Nachweis der Oxydase (Coeruloplasminnachweis) (8, 21, 29 a, 29 c)

Die Agarplatten mit den getrennten Proteinfraktionen werden 2 Stunden lang in bedeckten Cuvetten bei 37° C im Brutschrank in der folgend angegebenen Lösung belassen:

Lösung I:
21,6 mg p-Phenylendiamin werden in 100 ml eines Na-azetatpuffers ph 5,7 - Ionenstärke 0,1 gelöst und mit 10 ml einer 0,065 %igen Natriumazidlösung versetzt und das Ganze auf 37° C erhitzt.

Herstellung der Natriumazidlösung:
0,650 g Natriumazid ad 1000 ml aqua dest.

Herstellung des Natriumazetatpuffers ph 5,7 - Ionenstärke 0,1:
a) 12 ml Eisessig ad 1000 ml aqua dest.
b) 27,2 g Na-azetat + 3 H_2O ad 1000 ml aqua dest.
von a) 95,0 ml, von b) 1000 ml.
Dieser Puffer ist eine Zeit lang haltbar.
Wichtig ist, daß das eigentliche Reagenz, die p-Phenylendiaminlösung jeweils unmittelbar vor Gebrauch bereitet werden muß.
Jetzt werden die Agarplatten zweimal nacheinander je 2 Stunden lang in einem Natriumazetatpuffer ph 5,7 - Ionenstärke 0,1 (Lösung II) ausgewaschen und anschließend bei 37° C getrocknet.

Lösung II:
a) 12 ml Eisessig ad 1000 ml 50 %igen Äthylalkohols
b) 27,2 g Natriumazetat + 3 H_2O ad 1000 ml 50 %igen Äthylalkohols.
Von der Essigsäurelösung unter a) werden 455,0 ml mit der unter b) angegebenen Natriumazetatlösung ad 1000 ml aufgefüllt.
Gut verschlossen ist dieser Puffer haltbar.

Lösung III:
Will man die fertigen Elektrophoresestreifen von der Glasplatte abziehen und die übrigen Serumfraktionen auspräzipitieren, so muß man wie folgt vorgehen:

Die Platten kommen in ein Bad mit einer 2 %igen Essigsäurelösung, versetzt mit Glyzerin und werden wiederum getrocknet. (20,0 ml Eisessig + 150 ml Glyzerin ad 1000 ml aqua dest. bei Zimmertemperatur mischen).

Die gefärbten Fraktionen können photometrisch ausgewertet werden. Die Farbintensität (Braunfärbung) bzw. das Ausmaß der gewonnenen Gradientenkurve entspricht dabei der Coeruloplasminkonzentration (quantitativer Nachweis).

Nachweis der Amylase (18, 23)

Es wird eine 3 %ige Stärkelösung durch Erhitzen (fast bis zum Kochen) in einer 1 %igen Natriumchloridlösung hergestellt. (1 g NaCl ad 100 ml aqua dest., dazu 3 g Stärke p. A. im Wasserbad erhitzen). Diese wird mit Michaelispuffer ph 8,6 - Ionenstärke 0,05 gemischt, wobei 30 ml der Stärkelösung ad 100 ml Puffer aufgefüllt werden. In bedeckter Cuvette bleiben die Agarplatten 30 Minuten in dieser Lösung im Brutschrank bei 37° C. Danach wird die Lösung verworfen, die Platten mit 20 %iger Sulfosalicylsäure überschichtet und 10 Minuten lang unter leichtem Schwenken in dieser Lösung gehalten. (40 g Sulfosalicylsäure ad 200 ml aqua dest.) Die Objekte kommen nun in eine Jodlösung bis die Agarschicht gleichmäßig violettblau ist. (10 ml der 2 %igen alkoholischen Tinctura jodii ad 200 ml aqua dest.) Sofort photographisch festhalten, da unbeständig.

An den Stellen des Stärkeabbaues durch Amylase bleiben weiße bis rötliche Aussparungen. Sie erscheinen im Serum, Harn, Speichel und den meisten menschlichen Organextrakten im Bereich der β_2-Globuline.

Nachweis der alkalischen Phosphatase (26)

Reagenz I = alkalische Substrat-Pufferlösung
10,3 g Veronal-Natrium werden mit
6,5 ml n/10 Natrolauge und
0,304 g Na-Phenolphtaleindiphosphat auf
500 ml aqua dest. aufgefüllt und mit
3,75 ml Chloroform zur Konservierung der Lösung versetzt.
Die Platten werden unmittelbar nach der Elektrophorese in eine feuchte Kammer gelegt und mit einer doppelten Lage Filterpapier bedeckt. Dieses wurde zuvor mit Reagenz I gut getränkt. Die Elektrophoreseplatten müssen mindestens 4 Stunden in der feuchten Kammer bleiben.

Reagenz II = Glykokollpuffer
a) 4,595 g Glykokoll p.A.
b) 5,85 g Natriumazetat p.A.
c) 3,585 g Natriumchlorid
d) 50 ml 1 n Natronlauge (karbonatfrei)
e) 20,0 g Natriumpyrophosphat
Die Substanzen a) bis einschließlich e) werden mit aufgekochtem aqua dest. ad 500 ml aufgefüllt.

Die Platten aus der feuchten Kammer mit Reagenz I kommen in eine neue Cuvette und werden mit Reagenz II überschüttet. Nach 15 Minuten ist die Färbung abgeschlossen. Im Bereich der alkalischen Phosphataseaktivität tritt eine Rotfärbung auf.

III) Ergebnisse

Agarelektrophoretische Ergebnisse von Färbe- und Fermentreaktionen

1. Kaninchen (Abb. 1)

Proteine:

Die agarelektrophoretische Trennung ermöglichte eine Differenzierung der Serumproteine des Kaninchens in insgesamt 5 sichere Fraktionen, unter welchen an Intensität die am weitesten anodisch gewanderte Komponente auffiel; stark angefärbt war darüber hinaus ein um die Auftragestelle gelegenes Protein, das wohl einem β-Globulin zuzuordnen ist.

Glykoproteide:

Mit Perjodsäure und Schiffschem Reagenz ließen sich vor allem die anodisch gewanderten Proteine, unter ihnen insbesondere die als α_2-Globulin zu definierende Fraktion anfärben. Der am weitesten kathodisch gewanderte Komplex war weniger gut darstellbar.

Lipoproteide:

Mit Sudanschwarz B konnten im wesentlichen 2 Farbzonen dargestellt werden, die eine weit im anodischen, die andere im Gebiet der α_2- und β-Globuline.

Esterase:

An esteraseaktiven Fraktionen konnte mit Indoxylazetat im wesentlichen eine Fraktion im α-Globulinbereich nachgewiesen werden; eine zweite stellte sich vielfach unmittelbar anodisch vor der Auftragestelle dar.

Mit β-Naphthylazetat waren regelmäßig 3 kräftig färbbare Komponenten im anodisch gewanderten Bereich nachzuweisen; vielfach zeichnete sich an der Stelle der Präalbumine eine weitere, schmalbasige, jedoch weit weniger gefärbte Fraktion ab.

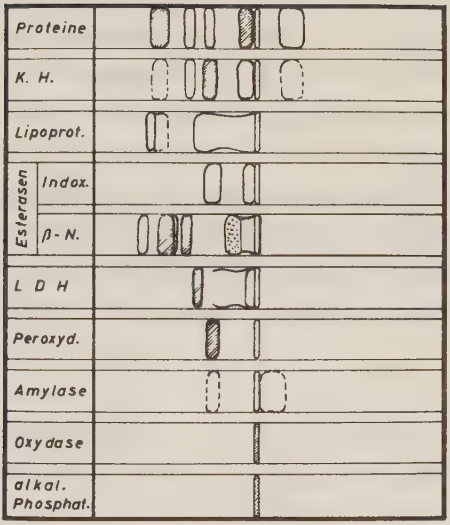

Abb. 1 Kaninchen

LDH:

Mit Regelmäßigkeit war etwa an der Stelle zwischen α_1 und α_2-Globulin eine schwach violett gefärbte Bande aufzuzeigen. Darüber hinaus ließen sich in Einzelfällen zwischen dieser und dem Auftragestrich und außerdem andeutungsweise auch unmittelbar kathodisch vom Start Farbzonen nachweisen, die dem Ort geringer Fermentaktivitäten entsprechen dürften.

Peroxydase:

Mit der Benzidinreaktion ließ sich an umschriebener Stelle im Bereich der α_2-Globuline eine positive Farbreaktion nachweisen.

Amylase:

Amylaseaktivität war in einem Bereich unmittelbar kathodisch von der Auftragestelle in offenbar nur geringem Ausmaße nachweisbar. Eine weitere schwache Aufhellungszone wurde auch im Bereich einer der α-Fraktionen faßbar.

Oxydase sowie alkalische Phosphatase

fanden sich in Spuren auf der Auftragestelle.

2. Ratte (Abb. 2)

Proteine:

Mit Amidoschwarz 10 B ließen sich insgesamt 5 - 6 Fraktionen nachweisen. Diese Variierung zwischen 5 und 6 Fraktionen kam so zustande, daß im α_2-Bereich in Einzelfällen zwei, in anderen drei Komponenten differenzierbar wurden. An Intensität imponierte die am weitesten anodisch gewanderte Albuminfraktion sowie eine den β-Globulinen zuzuordnende Komponente.

Glykoproteide:

Mit Schiffschem Reagenz konnten 3 maximal 4 Farbzonen differenziert werden, unter ihnen fiel eine intensiv gefärbte Fraktion im Albuminbereich auf; mit geringerer Wanderungsgeschwindigkeit fand sich eine schmalere, schwächer gefärbte Komponente, die den α-Globulinen zuzuordnen ist. Um die Auftragestelle sowie im kathodischen Bereich wurden je eine schwache Anfärbung sichtbar.

Lipoproteide:

Mit Sudanschwarz B wurden drei Farbzonen faßbar, die eine weit im anodischen, d.h. vor den Albuminen, eine weitere im Bereich der Albumin-α_1-Fraktion, die dritte schließlich an der Stelle von α_2-Globulinen; außerdem färbte sich die Auftragestelle.

Esterase:

Mit Indoxylazetat ließen sich drei Farbzonen, zwei aneinanderliegende im Albumin-α_1-Bereich sowie eine unmittelbar anodisch vor der Auftragestelle nachweisen.
Mit β-Naphthylazetat waren im allgemeinen 4 Komponenten zu differenzieren, 1 weit im anodsichen, d.h. vor den Albuminen; 1 Komplex im Albumin-α_1-Bereich, der drei Komponenten erkennen ließ; die vierte ging als unscharf begrenzte Zone von der Auftragestelle aus.

LDH:

An LDH-aktiven Komponenten waren zwei weit im anodischen differenzierbar. Eine fragliche Fraktion unmittelbar vor der Auftragestelle konnte in Einzelfällen zusätzlich beobachtet werden.

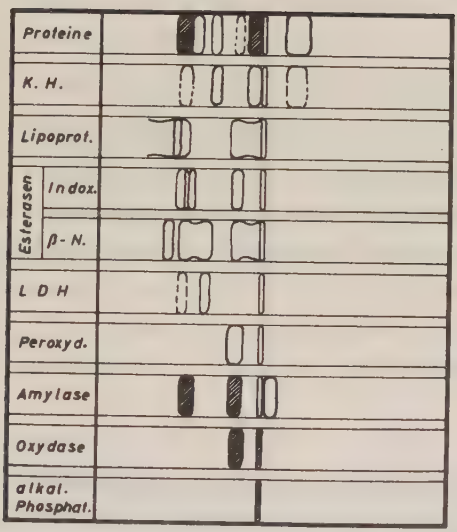
Proteine
K. H.
Lipoprot.
Esterasen
Indox.
β-N.
L D H
Peroxyd.
Amylase
Oxydase
alkal. Phosphat.

Abb. 2 Ratte

Peroxydaseaktivität

zeigte sich in einer breiten Zone anodisch vor dem Start, d.h. im Bereich der α_1-Globuline als relativ deutliche Farbreaktion.

Amylaseaktivität

fand sich in einem Bereich zwischen β und γ-Globulinen. Rotviolette Aufhellungszonen ließen sich darüber hinaus an der Stelle der Albumin- α_1-Globuline sowie der α_2-Fraktion nachweisen.

Oxydase:

Mit p-Phenylendiamin konnte nur im Bereich der α_2-Globuline eine deutliche Braunfärbung nachgewiesen werden.

Alkalische Phosphatase:

Die agarelektrophoretische Trennung ermöglichte keine Differenzierung einzelner Fraktionen; lediglich die Auftragestelle färbte sich rosa.

3. Maus (Abb. 3)

Proteine:

Mit Amidoschwarz 10 B ergaben sich 5 sichere Fraktionen. Eine kräftig hervortretende Komponente entsprach der Wanderungsgeschwindigkeit der Albumine. Es imponierten noch 2 Fraktionen im α-Globulinbereich. Kathodisch fiel um die Auftragestelle eine intensiv gefärbte Farbzone auf, die dem β-Globulin entsprechen dürfte.

Die Glykoproteidfärbung
zeigte vor allem anodisch gewanderte Proteine besonders eine kräftig hervortretende Fraktion an der Stelle der α-Globuline. Kathodisch wurde eine schwache Fraktion faßbar, die dem α-Globulin entsprechen kann.

Mit Sudanschwarz B
ließen sich 3 Farbzonen abgrenzen, die erste im Praealbuminbereich, die zweite, stärker und breiter an der Stelle der α_1-Globuline sowie eine schwach gefärbte, die den α_2-Globulinen zuzuordnen sein kann.

Esterase:
Mit Indoxylazetat konnte Esteraseaktivität an 2 Stellen sichtbar gemacht werden; unmittelbar anodisch vor der Auftragestelle sowie weit im anodischen, wobei dort 2 scharf begrenzte Fraktionen zu differenzieren waren.
Mit β-Naphthylazetat waren im wesentlichen 3 deutlich abgrenzbare Zonen zu erkennen, von welchen eine weit im anodischen Bereich besonders breit und intensiv zur Darstellung gelangte.

LDH-Aktivität
konnte auf Grund der Färbungen mit Nitroblautetrazolin in 5 Fraktionen nachgewiesen werden. Am stärksten imponierte eine breite, deutlich gefärbte Zone kathodisch unmittelbar hinter der Auftragestelle, während die 4 Fraktionen im anodischen schwächer gefärbt und schmaler waren, relativ am stärksten gefärbt auch hier ein Bezirk um den Start.

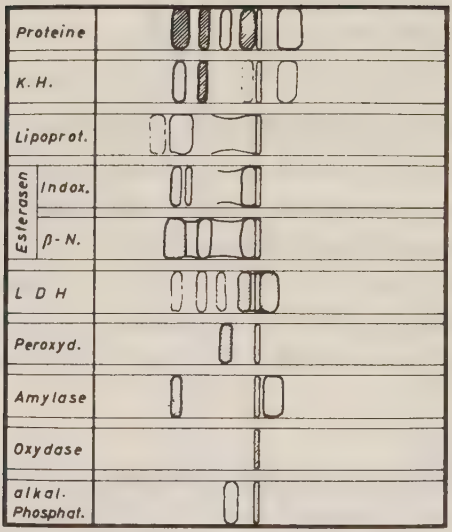
Proteine
K. H.
Lipoprot.
Esterasen
Indox.
β-N.
L D H
Peroxyd.
Amylase
Oxydase
alkal. Phosphat.

Abb. 3 Maus

Der Nachweis der Peroxydaseaktivität
mit Benzidin gelang an einer Stelle, und zwar im Bereich der α_2-Globuline.

Amylase:
Die Stelle des stärksten Stärkeabbaues war kathodisch als relativ breite Aufhellungszone im β_1-Globulinbereich nachweisbar. Anodisch zeigte sich eine schwache Rotviolettfärbung an der Stelle der Albumine.

Alkalische Phosphataseaktivität
konnte im vorliegenden Serum nur an der Auftragestelle sichtbar gemacht werden, desgleichen gelang mit der angewandten Farbreaktion.

Der Nachweis der Oxydaseaktivität
fraglich dargestellt im α_2-Globulinbereich.

4. Meerschweinchen (Abb. 4)

Proteine:
Mit Amidoschwarz 10 B ließen sich 5 Fraktionen darstellen. Eine Komponente, die besonders deutlich hervortrat, fand sich an der Stelle der größten elektrophoretischen Mobilität. Außerdem zeigten sich anodisch noch 2 Fraktionen an der Stelle der α-Globuline, von denen die erste nur schmal und schwächer gefärbt erschien. Im β-Globulinbereich wurde eine schmale Anfärbung faßbar. Kathodisch konnte eine kräftiger gefärbte Komponente dargestellt werden, ihr wären die α-Globuline zuzuordnen.

Die Glykoproteidfärbung
mit Perjodsäure und Schiffschem Reagenz ließen anodisch 5 Farbzonen erkennen, wovon die erste im Gebiet der größten Wanderungsgeschwindigkeit stärker, die zweite im α-Globulinbereich wesentlich schwächer zur Darstellung gelangten. Anodisch vor dem Start fand sich eine etwas breitere Fraktion, die dem β-Globulin entspricht. Kathodisch imponiert an der Stelle der γ-Globuline eine weitere Anfärbung.

Lipoproteide:
Mit Sudanschwarz B konnten 2 Fraktionen dargestellt werden, wobei die erste mit dem Albumin identisch ist; die zweite reicht mit einer schwachen Farbbande bis zur Auftragestelle und entspricht dem Bereich der α_2- β-Globuline.

Esterase:
Esteraseaktivität ließ sich mit Indoxylazetat als Komplex geringer Fermentaktivität nachweisen, der den α - β -Globulinen entsprechen dürfte.
Mit β-Naphthylazetat waren 3 esteraseaktive Komponenten abzugrenzen. Eine breite Farbzone findet sich im Gebiet der Albumin-α_1-Globuline. Von der Auftragestelle bis zum α_2-Bereich zieht eine weitere rot gefärbte Bande. Zwischen beiden liegt eine schmale Fraktion im α_1-Bereich.

LDH-Aktivität
gelangte nur in einer Zone mit der elektrophoretischen Mobilität der Albumine zur Darstellung.

Der Peroxydasenachweis
gelang mit Benzidin in einem unscharf begrenzten Bezirk anodisch vom Start an der Stelle der β-Globuline sowie im Bereich der α_2-Globuline.

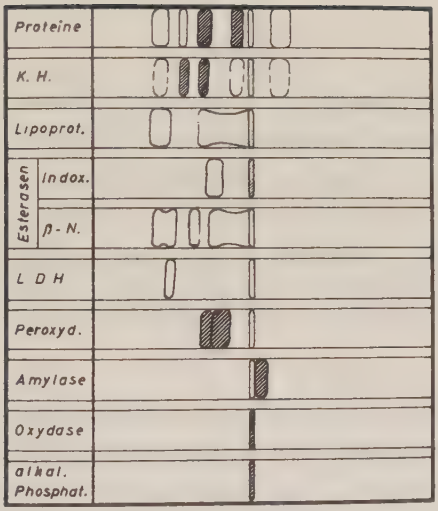

Abb. 4 Meerschweinchen

Amylaseaktivität
war im γ-Globulinbereich als scharf umrissene Aufhellungszone darstellbar.

Auch beim Meerschweinchen konnten alkalische Phosphatase und Oxydase nur an der Auftragestelle sichtbar gemacht werden.

5. Goldhamster (Abb. 5)
==========

Proteine:
Mit Amidoschwarz 10 B ließ sich kathodisch 1 deutlich begrenzte Farbzone darstellen, die wohl dem γ-Globulin entspricht, während anodisch 4 Komponenten faßbar waren. An der Stelle der Albumine fiel eine intensiv gefärbte, breite Fraktion auf, 2 weitere schwächer tingierte Komponenten entsprechen den α-Globulinen; unmittelbar vor dem Start fand sich die 4. der anodisch gewanderten Fraktionen, die dem β_2-Bereich zuzuordnen ist.

Die Glykoproteidfärbung
mit Schiffschem Reagenz erstreckte sich über 5 Komponenten, von denen wiederum eine kathodisch zur Darstellung gelangt und den γ-Globulinen entspricht. An der Stelle der größten Wanderungsgeschwindigkeit imponierte eine intensiv gefärbte Fraktion; weniger Farbintensität zeigten die beiden schmalen Zonen, die wohl mit den α_1- und α_2-Globulinen identisch sind. Etwas breiter und deutlicher wurde der β-Globulinbezirk faßbar.

Die Lipoproteide
wurden mit Sudanschwarz B in 2 Farbbanden anodisch faßbar, wovon die eine im Albuminbereich schwächer gefärbt erschien. Von der Auftragestelle bis zum α_2-Bereich zog sich eine schwache Fraktion.

Esterase:

Mit Indoxylazetat ließ sich nur eine Komponente darstellen, die dem α_2-Bereich entsprechen dürfte, während mit β-Naphthylazetat 3 Fraktionen sichtbar gemacht werden konnten. Die Stelle der größten Fermentaktivität entsprach dem Albumin. Eine weitere breite Bande reichte von der Auftragestelle anodisch bis in den α_2-Bereich. Zwischen beiden Komplexen lag eine schmalbasige Komponente, die den α_1-Globulinen zuzuordnen ist.

LDH-Aktivität

zeigte sich auf Grund der angewandten Farbreaktion in einem unscharf begrenzten Bezirk, der dem Albumin-α_1-Bereich gleichkommt.

Peroxydaseaktivität

konnte in 2 dicht hintereinander liegenden Zonen anodisch nachgewiesen werden. Sie entsprechen den α-Globulinen.

Amylaseaktive Zonen

konnten nicht nachgewiesen werden; es zeigte sich allenfalls kathodisch im γ-Globulinbereich eine leichte Rotviolettfärbung.

Alkalische Phosphatase- und Oxydaseaktivität wurden, abgesehen von leichten Anfärbungen an den Auftragesstellen, nicht sichtbar.

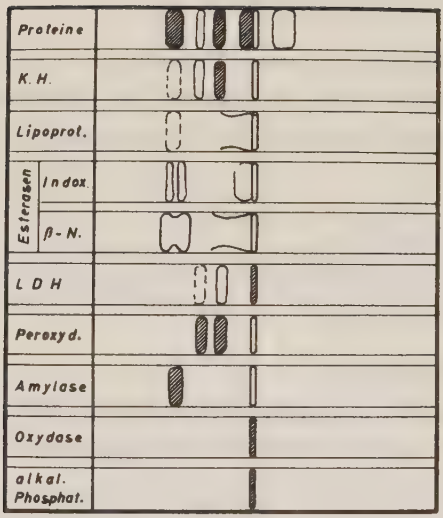

Abb. 5 Goldhamster

IV) Diskussion

Aus den vorliegenden Untersuchungsergebnissen ist zu entnehmen, daß die Serumeiweißkörper verschiedener Tierspezies untereinander speziesgebundene Charakteristika aufweisen. Diese bestehen nicht nur in Relationsunterschieden sondern auch in qualitativen Verschiedenheiten. Das zeigt sich schon darin, daß bei Färbung mit Amidoschwarz 10 B eine unterschiedliche Anzahl von Serumeiweißkomponenten dargestellt werden kann und unabhängig davon deutlich faßbare Differenzen in der Länge der Trennstrecke der zu vergleichenden Seren offensichtlich wird. Außerdem läßt sich nachweisen, daß bei Anwendung zusätzlicher Farb- und Fermentreaktionen weitere Unterschiede in den einzelnen Serumproteinfraktionen der verschiedenen Tierspezies bestehen.

Es ergeben sich für die Proteinfärbung der getrennten Serumfraktionen 5 - 6 verschiedene Komponenten unterschiedlicher Intensität. Glykoproteide finden sich in den hier untersuchten Seren vor allem im α-Globulinbereich; die Zahl der anfärbbaren Komponenten war sehr unterschiedlich. Die Färbung mit Sudanschwarz B ergibt 2 - 3 Komponenten, die alle weit im anodischen liegen oder von der Auftragestelle ausgehen. Bei der Untersuchung auf Esteraseaktivität fällt allgemein auf, daß die mit Indoxylazetat behandelten Seren nur schwache und wenig ergiebige Befunde zeigten, d.h. daß sich im allgemeinen nur 1 - 2 Farbzonen darstellen, während mit β-Naphthylazetat verhältnismäßig eindrucksvolle Bilder entstehen. Die Fermentaktivität scheint übereinstimmend an die Globuline des α_1-Bereiches gebunden zu sein. Die Ergebnisse der LDH sind sehr

unterschiedlich. Es fällt zunächst auf, daß allgemein lediglich 1 - 2 Komponenten anfärbbar sind. Nur beim Mäuseserum finden sich 5 deutlich abgrenzbare Farbzonen im Gegensatz zu MARKERT und APPELLA (12), die 4 Fraktionen darstellen; in Übereinstimmung mit ihren Ergebnissen bei der Untersuchung des Kaninchenserums kann in dem vorliegenden Kaninchenserum nur 1 deutlich anfärbbare Fraktion an der Stelle der α-Globuline nachgewiesen werden. Peroxydaseaktive Zonen zeigen sich in den verschiedenen Tierseren vorwiegend im α-Globulinbereich sowie beim Meerschweinchen in einem unscharf begrenzten Bezirk an der Stelle der β-Globuline. Von den übrigen Fermenten: Oxydase und alkalische Phosphatase sind die Ergebnisse wenig ergiebig. Amylase-Aktivität stellt sich in unterschiedlicher Intensität und an verschiedenen Stellen dar; lediglich in den Seren des Kaninchens und der Ratte fallen 2 Stärkeabbauzonen auf.

C) Zusammenfassung

In vorliegender Arbeit werden die Serumeiweißkörper folgender Tiere agarelektrophoretisch getrennt: Kaninchen, Ratte, Maus, Meerschweinchen und Goldhamster. Zur Charakterisierung der einzelnen Fraktionen werden die Proteine, Glykoproteide, Lipoproteide, esterase-, LDH-, peroxydase-, amylase- und alkalische Phosphatase-aktiven Komponenten mit verschiedenen Farb- und Fermentnachweismethoden weiter analysiert.

Dabei fällt auf, daß die verschiedenen tierischen Serumeiweißkörper im Vergleich untereinander und im Vergleich mit anderen Tierseren speziesgebundene Charakteristika aufweisen.

An Fermenten sind vor allem die Esterasen deutlich nachweisbar, die sich jedoch von Tier zu Tier unterscheiden. Die LDH-Aktivität ist in den meisten Fällen nur in Gestalt einer oder zweier Komponenten nachweisbar. Lediglich bei der Maus können 5 Banden dargestellt werden. Die anderen untersuchten Fermente: Oxydase, Peroxydase und alkalische Phosphatase sind so gering vertreten, daß sie mit den hier angewandten Färbemethoden kaum dargestellt werden. Lediglich die Amylaseaktivität läßt sich in 1 bis höchstens 3 Zonen nachweisen. Auch bei den Relationen der Serumproteine der verschiedenen Tierseren - Proteine, Glykoproteide und Lipoproteide - ergeben sich Unterschiede von Spezies zu Spezies.

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse sollen ein Beitrag für die tierexperimentelle Serumeiweißforschung sein.

D) Literaturnachweis

1) AUGUSTINSSON, K.B.:

a) Studies on blood plasma esterases.
Acta Chem. Scand. 13, 571-592, 1081-1096, 1097-1105 (1959)

b) The LKB 3340 column electrophoresis apparatus used in studies on blood plasma esterases.
Science Tools 10, 57-58 (1963)

2) BERG, G., K.H. KIMBEL und F. SCHEIFFARTH:
Zur Schwankungsbreite der Serumeiweißfraktionen normaler Versuchsratten.
Naturwiss. 42, 51 (1955)

3) DEUTSCH, H.F. und M. B. GOODLOE:
An electrophoretic suevey of various animal plasma.
J. Biol. Chem. (Am.) 161, 1 (1945)

4) DIMOPOULLOS, G.T., G.T. SCHRADER und B. FLETSCHER:
Electrophoretic studies of bovine serum. IV. Differences in serem glycoproteins due to age and sex.
Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 102, 704-707 (1959)

5) EDSALL, J.T.:
The plasma proteins and their fractionation.
Adv. Protein Chem. (Am.) 3, 383 (1947)

6) FISCHER, R. und F. WULEN:
Die Dysproteinämie im Tierexperiment,
Vergleichende Untersuchungen beim Meerschweinchen, Kaninchen und der Ratte.
Z. exper. Med. 130, 538-546 (1959)

7) GRABAR, P.:
Études sur les protéines à l'aide de méthode immunochimique.
Bull. Soc. Chim. biol. 36, 65 (1954)

8) GRABAR, P. et P. BURTIN:
a) Analyse immuno-électrophorétique.
Masson, Paris 1960

b) Immunoelektrophoretische Analyse.
Elsvier, (Amsterdam) (1964)

9) GRABAR, P. et C.A. WILLIAMS:
a) Méthode permettant l'étude conjugée des propriétés électrophorétique et immunochimique d'un mélange de protéines; application au sérum sanguin.

b) Méthode immuno-électrophorétique d'analyse de substances antigéniques.
Biochim. biophys. Acta 17, 67 (1965)

10) HENNING, N.:
Klinische Laboratoriumsdiagnostik.
Urban und Schwarzenberg München, Berlin
3. Aufl. S. 91-96, 281-291 (1966)

11) HUDGINS, P. C. und R. A. PATNODE:
Electrophoretic studies of serum protein and glycoprotein in the tuberkulous rat, rabbit and guinea pig.
Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 95, 181-183 (1957)

12) MARKERT, C.L. und E. APPELLA:
Ann. N. Y. Acad. Sci. 103, 951 (1961)
zitiert bei:
J. HENRY WILKINSON D. SC.
Isoenzymes.
E. u. F. N. SPON LTD London (1965)

13) MOORE, D.H.:
Species differences in serum protein potterns.
J. Biol. Chem. (Am.) 161, 21 (1945)

14) PETZOLD, F. A.:
Lipide und Lipoproteide im Blutplasma.
Springer Verlag, Berlin - Göttingen - Heidelberg
S. 156 (1961)

15) ROHATGI, K. und S. BANERJEE:
Serum lipoproteins and glycoproteins in aminopterin treated rats.
Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 102, 761 - 763 (1959)

16) SCHEIDEGGER, J.J.:
Une microméthode de l'immuno-électrophorèse.
Int. Arch. Allergy 7, 103 (1955)

17) SCHEIFFARTH, F. und G. BERG:
Serumeiweißbestimmungen bei Ratten und Kaninchen mit der Papierelektrophorese. I. Mitt.: Die Normalwerte bei Ratten und Kaninchen.
Z. exper. Med. 119, 550 (1952)

18) SCHEIFFARTH, F. und H. GÖTZ:
Eine Methode zum Diastasenachweis agarelektrophoretisch getrennter Proteingemische.
Klin. Wschr. 42, 130 (1964)

19) SCHEIFFARTH, F., H. GÖTZ und J. ANDRACK:
Papier- und agarelektrophoretische Studien über die Serumprotein-Konstellation bei Meerschweinchen.
Z. Naturforschg. 18 b, 543 - 551 (1963)

20) SCHEIFFARTH, F., H. GÖTZ und R. BALOGH:
Die Serumproteine des Tieres.
(Agarelektrophoretische Studien zur Charakterisierung der Serumproteine von Ziege, Hund, Katze, Ente und Huhn.)
Arbeit im Druck

21) SCHEIFFARTH, F., H. GÖTZ und F. CZAGANY:
Zur quantitativen Bestimmung der Coeruloplasmin-konzentration im Serum.
Med. Welt 28, 1449 (1961)

22) SCHEIFFARTH, F., H. GÖTZ und S. EBERT:
Über esteraseaktive Fraktionen der verschiedenen menschlichen Organextrakte.
Arbeit im Druck

23) SCHEIFFARTH, F., H. GÖTZ und D. HOFFMANN:
Diastasenachweis in einigen menschlichen Organextrakten mit Hilfe der Elektrophorese im Agargel.
7. Gastroenterologie 2, 76 (1964)

24) SCHEIFFARTH, F., H. GÖTZ und O. KNELLER:
Weitere statistische Untersuchungen der Serumeiweiß-verhältnisse unbehandelter Albinoratten.
Naturwiss. 44, 639 (1957)

25) SCHEIFFARTH, F., H. GÖTZ und G. POTZEL:
Agarelektrophoretische Studien zur Charakterisierung der Serumproteine von Hammel, Rind, Pferd und Schwein im Vergleich zu einem Humanserum.
Arbeit im Druck

26) SCHEIFFARTH, F., H. WARNATZ und H. GÖTZ:
Zum qualitativen und quantitativen Nachweis der alkalischen Phosphatase im Serum mit Hilfe der Agarelektrophorese.
Med. Welt 43, 2216 (1961)

27) SCHULTZE, H.E., M. SCHÖNEBERGER und H.D. MATHEKA:
Zur Kenntnis der γ-Globuline und antitoxischen Immunglobuline.
Behringwerke - Mitteilungen 26, 21-57 (1952)

28) SCHWICK, G. und K. STÖRIKO:
Immunoelektrophorese.
Laboratoriumsblätter, Behringwerke, Marburg (Lahn)
Mai, 61-64 (1964)

29) URIEL, J.:
a) Étude de l'activité enzymatique de la céruloplasmine du sérum humain après électrophorèse et immuno-électrophorèse en gélose.
Bull. Soc. Chim. biol. 39, Suppl. I, 105 (1957)

b) Les réactions de caractérisation des constituands des liquides biologique après électrophorèse en gélose. Clin. Chim. Acta 3, 17 (1958)

c) Interprétation quantitative des résultats après électrophorèse en gélose. I. Considérations générates. Application à l'étude constituands protéines isolés. Clin. Chim. Acta 3, 234 (1958)

d) Interprétation quantitative des résultats après électrophorèse en gélose. II. Les protéines et lipoprotéines du sérum humain normal. Clin. Chim. Acta 3, 384 (1958)

30) URIEL, J. et P. GRABAR:

a) Emploi de colorants dans l'analyse électrophorétique et immuno-électrophorétique en milieu gélifié. Ann. Inst. Pasteur 90, 429 (1956)

b) Étude des lipoprotéines sériques par l'électrophorèse en gélose et l'analyse immuno-électrophorétique. Bull. Soc. Chim. biol. 37, 165 (1955)

31) URIEL, J. et J.J. SCHEIDEGGER:
Électrophorèse en gélose et coloration des constituants. Bull. Soc. Chim. biol. 37, 165 (1955)

32) VAN DER HELM, B.J.:
A simplified method of demonstrating lacticdehydrogenase isoenzymes in seren.
Clin. Chim. Acta 7, 124 (1962)

33) WILLIAMS, C.A. und P. GRABAR:
Immunoelectrophoretic studies on serum proteins.
I. The antigens of human serum.
J. Immunol. 74, 158 (1955)

Herrn Prof. Dr. F. Scheiffarth möchte ich für die Themastellung sowie für die Übernahme des Referates meinen ergebenen Dank sagen.

Frau Dr. H. Götz danke ich für ihre freundliche Beratung sowie für ihre wertvolle Anleitung.

Lebenslauf

Am 28.10.1940 wurde ich in Nürnberg als Tochter des Dr.-Ing. Kurt Bossert und seiner Ehefrau Maria geb. Hoffner geboren.

Die Volksschule besuchte ich in Grefrath Bez. Köln. Nach 9-jährigem Besuch des Neusprachlichen Gymnasiums Bergheim/Erft legte ich dort im Februar 1960 die Reifeprüfung ab.

An der Universität zu Köln begann ich im SS 1960 mit dem Medizinstudium. Nach dem Vorphysikum wechselte ich im WS 1961/62 zur Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg über, wo ich im Februar 1964 das Physikum bestand.

Nach 6 klinischen Semestern legte ich zwischen dem 9.3.1967 und 1.8.1967 an der Universität Erlangen-Nürnberg das medizinische Staatsexamen ab.

Offsetdruck - Fotodruck
Josef Hogl
8520 Erlangen, Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz,) Tel. 22990

Offsetdruck - Fotodruck

- J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Telefon 22990 -